ChinaXiv合作期刊

赖氨酸对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达和蛋白磷酸化的影响

陈　璐　赵艳丽　郭晓宇　史彬林　闫素梅*

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究赖氨酸（Lys）对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）内乳蛋白合成相关基因表达和蛋白磷酸化的影响，深入探讨 Lys 对乳蛋白合成影响的机理。将第 3 代 BMECs 随机分为 6 组，各组 Lys 的浓度分别为 0.5（对照）、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 mmol/L，每组 6 个重复。37 ℃、5% CO_2 培养 48 h，之后采用化学发光法测定 BMECs 内三磷酸腺苷（ATP）的含量，采用实时荧光定量 PCR 法测定乳蛋白合成相关基因表达量以及采用蛋白质免疫印迹法测定乳蛋白合成相关蛋白的磷酸化水平。结果表明：随着 Lys 浓度的增加，ATP 含量呈趋于显著的二次曲线升高（P=0.050）;κ-酪蛋白（*CSN*3）（P=0.093）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（*mTOR*）（P=0.005）、真核起始因子 4E（*eIF4E*）（P=0.076）和磷酸腺苷活化的蛋白激酶α1（*AMPKα*1）基因表达量（P=0.045）呈显著或趋于显著的二次曲线变化，均为先升高后降低；α-酪蛋白（*CSN*1*S*1）基因表达量（P=0.081）及 mTOR（P=0.038）和 p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1（S6K1）磷酸化水平（P=0.022）呈显著或趋于显著的一次线性降低；磷酸腺苷活化的蛋白激酶(AMPK)的磷酸化水平呈显著的一次线性升高（P=0.014）。方差分析结果显示，添加 Lys 显著影响 ATP 含量、乳蛋白合成相关基因表达量及 eIF4E 磷酸化水平（P<0.05），其中，ATP 含量以 2.0~16.0 mmol/L 组，*CSN*1*S*1、β-酪蛋白（*CSN*2）、信号转导和转录激活因子 5（*STAT*5）以 1.0~2.0 mmol/L 组，*mTOR* 基因表达量以 1.0~8.0 mmol/L 组，*CSN*3 基因表达量以 1.0~4.0 mmol/L 组，酪氨酸激酶 2（*JAK*2）基因表达量以 1.0~16.0 mmol/L 组，*S6K*1 基因表达量以 2.0 mmol/L 组，*eIF4E* 基因表达量以 2.0~8.0 mmol/L 组，eIF4E 磷酸化水平以 2.0~4.0 mmol/L 组时促进效果较好，但 16.0 mmol/L 组 *CSN*1*S*1、*CSN*3、*STAT*5 及 *mTOR* 基因表达量受到抑制，1.0~16.0 mmol/L 组真核起始因子 4E 结合蛋白 1（4*EBP*1）基因表达量

收稿日期：2018-01-25

资助项目：国家奶业“973 计划”项目（2011CB1008003）

作者简介：陈　璐（1990-），女，山西襄汾人，硕士研究生，从事奶牛营养研究。E-mail：1510560671@qq.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail：yansmimau@163.com

chinaXiv:201812.00283v1

受到抑制。总之，Lys 浓度为 1.0~2.0 mmol/L 时，对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的促进效果较好。

关键词：奶牛；乳腺上皮细胞；赖氨酸；乳蛋白

中图分类号：S823

乳蛋白是牛奶的主要成分，是评价牛奶质量的重要指标。氨基酸（amino acid，**AA**）是合成乳蛋白的主要前体物，可以影响乳蛋白合成[1]。赖氨酸（lysine，**Lys**）是乳蛋白合成主要的必需氨基酸（essential amino acid，**EAA**），也是奶牛的限制性氨基酸。因此，深入研究 Lys 对乳蛋白合成的影响及机理，对调节乳腺内乳成分的合成和改善乳品质具有重要意义。李沐阳等[2]研究发现，玉米秸秆饲粮条件下奶牛阴外动脉灌注氨基酸能促进乳蛋白合成。王立娜[3]以奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，**BMECs**）为模型在培养基中添加 EAA 发现，乳蛋白的合成量增加了。Giallongo 等[4]研究发现，奶牛灌注过瘤胃 Lys 后促进乳蛋白合成的同时，也改善了乳品质。可见，Lys 在一定程度上影响了乳蛋白的合成，但前人的研究多集中在向奶牛体内灌注 Lys 影响乳蛋白合成的方面，对体外添加 Lys 影响乳蛋白合成及其机理方面的探索研究甚少，有必要对此进行深入试验研究。鉴于此，本研究以 BMECs 为模型，研究不同浓度 Lys 对乳蛋白合成相关基因表达和蛋白磷酸化的影响，为进一步探讨 Lys 对 BMECs 内乳蛋白合成的影响机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Ⅱ型胶原酶、DMEM/F12 培养基、胰岛素转铁蛋白硒钠、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸（EDTA）购自 Gibco 公司；Lys（货号 L8662）、氢化可的松、表皮生长因子、催乳素、琼脂糖购自 Sigma 公司；RNAiso PLUS、PrimeScript RT Master Mix 和 SYBR Premix ExTaq™ Ⅱ购自 TaKaRa 公司；兔抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）抗体（货号 ab2732）、兔抗磷酸化 mTOR 抗体（货号 ab84400）、兔抗真核起始因子 4E（eukaryotic initiation factor 4E，eIF4E）抗体（货号 ab72116）、兔抗磷酸化 eIF4E 抗体（货号 ab4774）、兔抗 p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1（ribosomal protein S6 kinase 1，S6K1）抗体（货号 ab64804）、兔抗磷酸化 S6K1 抗体（货号 ab126818）、兔抗真核起始因子 4E 结合蛋白 1（eukaryotic initiation 4E binding protein 1，4EBP1）抗体（货号 ab2606）、兔抗磷酸

chinaXiv:201812.00283v1

ChinaXiv合作期刊

化 4EBP1 抗体（货号 ab75767）购自 Abcam 公司；兔抗磷酸腺苷活化的蛋白激酶α1（adenosine 5’-mono-phpsphate-active protein kinase，AMPKα1）抗体（货号 YT0216）和兔抗磷酸化 AMPKα1 抗体（货号 YP0575）购自 Immunoway 公司；一抗稀释液、二抗稀释液、十二烷基四乙酸二钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）电泳液、转膜液、ECL 化学超敏显色液购自北京碧云天公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗兔二抗（货号 04-15-06）购自 KPL 公司。主要仪器：全自动酶标仪（Synergy H4，美国 BioTek）、实时荧光定量 PCR 仪（ABI-7500，美国 ABI）、电泳仪、转膜仪、蛋白成像系统（美国 BIO-RAD）。

1.2 原代 BMECs 的体外培养与试验设计

在内蒙古自治区呼和浩特市北亚清真屠宰场选取 3 头 3~5 岁经产的健康泌乳中期的高产荷斯坦奶牛乳腺组织，参考 Sheng 等[5]采用的胶原酶消化法获得和培养 BMECs，当原代细胞贴壁率达到 80%~90%后，用 0.25%胰蛋白酶/EDTA 对细胞进行纯化和传代。将第 3 代 BMECs 按照试验要求的细胞密度接种于不同细胞培养板上，于 37 、5% CO_2 条件下培养 24 h。当细胞贴壁率达到 80%~90%时，换为饥饿培养基，培养 12 h 后，采用单因素完全随机试验设计，将细胞分为 6 组，在每组中加入不同浓度的 Lys 工作液，使反应体系中 Lys 终浓度分别为 0.5（对照）、1.0、2.0、4.0、8.0 和 16.0 mmol/L，每组 6 个重复，培养 48 h。DMEM/F12 培养基中 Lys 的浓度为 0.5 mmol/L，Lys 的浓度参考高海娜[6]和李喜艳[7]的研究结果，并通过测定细胞相对增殖率[相对增殖率(%)=(试验组 $OD_{490\ nm}$/对照组 $OD_{490\ nm}$)×100]确定。

1.3 测试指标与方法

BMECs 内 ATP 的含量采用化学发光法测定。将细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔培养板上，按试验设计培养结束后，弃上清，每孔加入 200 μL 裂解液，待细胞充分裂解后，收集细胞悬液，4 ℃、15 455×*g* 离心 5 min，取上清，立即根据 ATP 检测试剂盒说明书的方法进行测定，即用 ATP 检测裂解液将 ATP 标准溶液稀释为 0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00 和 10.00 μmol/L 6 个浓度；然后，用 ATP 检测试剂稀释液将 ATP 检测试剂按 1:9 的比例稀释成 ATP 检测工作液；最后，在每个检测孔内加入 100 μL ATP 检测工作液，室温静置 3~5 min，再向每孔内加入 20 μL 样品，迅速混匀后用全自动酶标仪测定 Lum 值，再根据标准曲线计算出样品 ATP 浓度，用二辛可酸（BCA）蛋白质浓度试剂盒测样品中蛋白质浓度，将 ATP 浓度换算成 nmol/mg prot 形式。

chinaXiv:201812.00283v1

BMECs 内总 RNA 按照 Trizol 法提取。将细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔培养板，按试验设计培养结束后，用酶标仪检测总 RNA 的纯度与浓度，$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$ 在 1.8~2.2 表示提取的 RNA 纯度较好。总 RNA 完整性用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。将总 RNA 反转录成 cDNA，采用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒的方法进行，反转录体系为 10 μL。基因表达量采用 SYBR Premix Ex Taq^{TM} II 试剂盒的方法进行测定，反应体系为 20 μL。以磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）为管家基因，对乳蛋白合成相关基因[α-酪蛋白(α_{s1}-casein，*CSN1S1*)、β-酪蛋白(β-casein，*CSN2*)、κ-酪蛋白(κ-casein，*CSN3*)、酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2，*JAK2*)、信号转导和转录激活因子 5(signal transducer and activator of transcription 5，*STAT5*)、*mTOR*、*S6K1*、4*EBP1*、*eIF4E* 和 *AMPKα1*]的表达量进行测定，其引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 的反应程序为：95.0 ℃预变性 30 s；95.0 ℃变性 5 s，60 ℃退火 34 s，72 ℃延伸 20 s，进行 40 个循环反应；95 ℃、5 s，60 ℃、30 s，95 ℃、15 s，51 个循环，绘制熔解曲线。基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

表 1　乳蛋白合成相关基因的引物

Table 1　Primers of genes related to milk protein synthesis

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequences (5′-3′)	长度 Length/bp	参考文献 Reference
磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	XM_001252479	F：GGGTCATCATCTCTGCACCT R：GGTCATAAGTCCCTCCACGA	177	Sheng 等[5]
α-酪蛋白 *CSN1S1*	NM_181029	F：ACATCCTATCAAGCACCAAGGACTC R：GACGAAATGCTTTCAGCTTCCA	192	自行设计
β-酪蛋白 *CSN2*	M-64755.1	F：TCTGCCTCTGCTCCAGTCTT R：AGGAGGGGGCATTCACTTT	116	自行设计
κ-酪蛋白 *CSN3*	NM_174294	F：CCAGGAGCAAAACCAAGAAC R：TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	148	Sheng 等[5]
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	XM_001788228	F：TGAACTGGAGGCTGATGGACAC R：TGACTGGCCAGCAGAGTAGGAA	83	Sheng 等[5]
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4*EBP1*	BC120290	F：GGCAGGCGGTGAAGAGTC R：CCTGGGCTGCGGGAT	302	Sheng 等[5]
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 *S6K1*	DN544771	F：CAAGCTTGCATGCTAATTTGTCC R：TTGAGTCCTGATCATGTCGAAGA	101	Sheng 等[5]
信号转导和转录激活因子 5 *STAT5*	NM_001012673	F：AAGACCCAGACCAAGTTCGC	422	自行设计

chinaXiv:201812.00283v1

ChinaXiv合作期刊

		R：AGCACCGTGGCAGTAGCAT		
酪氨酸激酶 2 *JAK2*	DT897449	F：TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA R：AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	101	Sheng 等[5]
真核起始因子 4E *eIF4E*	NM_174310.3	F：GAAGACTTTTGGGCTCTGTAC R：CAGCTCCACATACATCATCAC	82	Sheng 等[8]
磷酸腺苷活化的蛋白激酶α1 *AMPKα1*	NM_001109802	F：ACCATTCTTGGTTGCTGAAACTC R：CACCTTGGTGTTTGGATTTCTG	80	自行设计

chinaXiv:201812.00283v1

BMECs 内乳蛋白合成相关的蛋白磷酸化水平采用蛋白质免疫印迹法测定。将细胞以 5×10^6 个/瓶的密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中，按试验设计培养结束后，弃掉上清，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗细胞 2 遍，每瓶加入 250 μL 含 0.1%苯甲基磺酰氟化物（PMSF）的放射免疫沉淀测定（RIPA）细胞裂解液，4 ℃裂解 5 min 后刮下细胞，收集细胞悬液，4 ℃、15 455×*g* 离心 10 min，取上清用于检测蛋白磷酸化水平。取适量样品用 BCA 法测定总蛋白质浓度，随后分别向 60 μg 的每种样品中添加 5×蛋白上样缓冲液，按照 4:1 的质量体积比混合，100 ℃加热 5 min 使蛋白质热变性，然后按照蛋白质免疫印迹法的步骤进行电泳、转膜；将转膜后的醋酸纤维素（PVDF）膜分别与用一抗稀释液稀释 500 倍的一抗结合，于 4 ℃孵育过夜，随后使其分别与用二抗稀释液稀释 1 000 倍的山羊抗兔二抗结合，室温摇床孵育 1 h；最后用 ECL 化学超敏显色液进行显色，在蛋白成像系统上照相分析。图片用 Quantity one 软件进行灰度值分析，各蛋白磷酸化水平数据采用各试验组与对照组相比的方法表示。

1.4 数据统计分析

数据采用 SAS 9.0 软件的方差分析程序（ANOVA）进行显著性检验，同时用回归统计程序进行一次线性与二次曲线回归分析，$P<0.05$ 表示组间的差异或回归关系显著，$0.05\leqslant P<0.10$ 表示组间的差异或回归关系趋于显著，$P\geqslant0.10$ 表示组间的差异或回归关系不显著。

2 结　果

2.1 Lys 对 BMECs 内 ATP 含量及乳蛋白合成相关基因表达的影响

由表 2 可知，BMECs 内 RGR 呈显著的一次线性下降（$P<0.001$），并且 4.0~16.0 mmol/L 组的 RGR 显著低于对照组和 1.0~2.0 mmol/L 组（$P<0.05$）；ATP 含量以 2.0～16.0 mmol/L 组显著高于对照组（$P<0.05$），2.0 mmol/L 组最高，回归分析结果显示，随着 Lys 浓度的增加，ATP 含量呈趋于显著的二次曲线升高（$P=0.050$）。随着 Lys 浓度的增加，*CSN1S1* 基因表达量呈趋于显著的一次线性降低（$P=0.081$）；以 1.0～2.0 mmol/L 组显著高于其他组

（$P<0.05$），尤以 2.0 mmol/L 组最高，但 4.0～16.0 mmol/L 组显著低于对照组和 1.0～2.0 mmol/L 组（$P<0.05$）。1.0～2.0 mmol/L 组的 *CSN*2 和 *STAT*5 基因表达量显著高于其他组（$P<0.05$），以 2.0 mmol/L 组最高，但 *CSN*2 以 8.0 mmol/L 组最低，*STAT*5 以 4.0～16.0 mmol/L 组显著低于对照组（$P<0.05$）；1.0～16.0 mmol/L 组的 *JAK*2 基因表达量显著高于对照组（$P<0.05$）。*CSN*3（$P=0.093$）、*mTOR*($P=0.005$)、*eIF*4*E*($P=0.076$)和 *AMPKα*1 基因表达量($P=0.045$)随着 Lys 浓度的增加呈显著或趋于显著的二次曲线变化，均为先升高后降低。*CSN*3 基因表达量以 1.0～4.0 mmol/L 组显著高于其他组，但 8.0～16.0 mmol/L 组显著低于对照组（$P<0.05$），*mTOR* 基因表达量以对照组和 1.0～8.0 mmol/L 组显著高于 16.0 mmol/L 组（$P<0.05$），*eIF4E* 基因表达量以 2.0～8.0 mmol/L 组显著高于其他各组（$P<0.05$），*AMPKα*1 基因表达量以 1.0～8.0 mmol/L 组显著高于其他组（$P<0.05$）。2.0 mmol/L 组的 *S6K*1 基因表达量最高，显著高于对照组（$P<0.05$），以 16.0 mmol/L 组最低。对于 4*EBP*1 的基因表达量，1.0～16.0 mmol/L 组较对照组显著降低（$P<0.05$）。

表 2　Lys 对 BMECs 内 ATP 含量和乳蛋白合成相关基因表达量的影响

Table 2　Effects of Lys on ATP content and the expression levels of genes involved in milk protein synthesis in BMECs

项目 Items	Lys 浓度 Lys concentration/(mmol/L)						SEM	方差分析 *P* 值 *P*-value for ANOVA	*P* 值 *P*-Value	
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0			一次 Linear	二次 Quadratic
相对增殖率 RGR/%	100.0^{a}	103.9^{a}	102.3^{a}	95.3^{b}	83.7^{c}	69.3^{d}	1.270	<0.001	<0.001	0.004
三磷酸腺 ATP/(ng/mg prot)	26.49^{b}	32.70^{ab}	43.12^{a}	37.45^{a}	42.35^{a}	38.09^{a}	3.224	0.036	0.182	0.050
α-酪蛋白 *CSN*1*S*1	1.00^{c}	1.52^{b}	1.66^{a}	0.71^{d}	0.45^{e}	0.38^{e}	0.042	<0.001	0.081	0.181
β-酪蛋白 *CSN*2	1.00^{c}	1.89^{b}	2.08^{a}	1.04^{c}	0.99^{c}	1.06^{c}	0.056	<0.001	0.369	0.645
κ-酪蛋白 *CSN*3	1.00^{b}	1.14^{a}	1.13^{a}	1.12^{a}	0.84^{c}	0.62^{d}	0.033	<0.001	0.178	0.093
信号转导和转录激活因子 5 *STAT*5	1.00^{c}	1.46^{b}	1.77^{a}	0.67^{d}	0.42^{e}	0.39^{e}	0.051	<0.001	0.103	0.230
酪氨酸激酶 2 *JAK*2	1.00^{d}	1.65^{c}	1.94^{bc}	2.37^{a}	2.26^{ab}	1.86^{c}	0.129	<0.001	0.489	0.141
真核起始因子 4E *eIF4E*	1.00^{c}	1.01^{c}	1.29^{b}	1.22^{b}	2.36^{a}	0.44^{d}	0.065	<0.001	0.652	0.076
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4*EBP*1	1.00^{a}	0.58^{c}	0.75^{b}	0.58^{c}	0.85^{b}	0.71^{bc}	0.042	<0.001	0.988	0.998
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	1.00^{a}	1.06^{a}	1.04^{a}	1.00^{a}	0.98^{a}	0.71^{b}	0.065	0.007	0.006	0.005
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 *S6K*1	1.00^{b}	1.09^{ab}	1.28^{a}	1.10^{ab}	1.07^{b}	0.93^{b}	0.060	0.005	0.242	0.427
磷酸腺苷活化的蛋白激酶α1 *AMPKα*1	1.00^{e}	1.24^{d}	1.54^{c}	2.00^{a}	1.77^{b}	0.85^{e}	0.071	<0.001	0.612	0.045

SEM 表示平均值的标准误。同行数据相同或无字母肩标表示差异不显著（$P>0.05$），不同字母肩标表

chinaXiv:201812.00283v1

chinaXiv:201812.00283v1

示差异显著（*P*<0.05）。*P*<0.05 表示回归关系显著；0.05≤*P*< 0.10 表示回归关系趋于显著；*P*≥0.10 表示回归关系不显著。下表同。

SEM means standard error of the mean. Values of the same row with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). *P* <0.05 means significant regression. 0.05≤*P*<0.10 means that regression tend to be significant. *P*≥0.10 means not significant regression. The same as below.

2.2 Lys 对乳蛋白合成相关蛋白磷酸化的影响

由表 3 和图 1 可知，随着 Lys 浓度的增加，mTOR（*P*=0.038）和 S6K1 磷酸化水平（*P*=0.022）呈显著的一次线性降低。eIF4E 的磷酸化水平以 2.0～4.0 mmol/L 组较高，显著高于其他各组（*P*<0.05），但 16.0 mmol/L 组与对照组相比差异不显著（*P*>0.05）。磷酸腺苷活化的蛋白激酶（AMPK）的磷酸化水平随着 Lys 浓度的增加呈显著的一次线性升高（*P*=0.014）。

表 3　Lys 对 BMECs 内乳蛋白合成相关蛋白磷酸化水平的影响

Table 3　Effects of Lys on phosphorylation levels of proteins involved in milk protein synthesis in BMECs

项目 Items	Lys 浓度 Lys concentration/(mmol/L)						SEM	方差分析 *P* 值 *P*-value for ANOVA	*P* 值 *P*-Value	
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0			一次 Linear	二次 Quadratic
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR(Ser2 448)	1.00	1.27	1.23	1.08	1.07	0.77	0.141	0.197	0.038	0.159
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4EBP1(Thr37)	1.00	1.02	0.99	0.87	0.95	0.91	0.106	0.841	0.429	0.683
真核起始因子 4E eIF4E(Ser209)	1.00^{c}	1.18^{b}	1.30^{a}	1.26^{a}	1.15^{b}	1.06^{c}	0.022	<0.001	0.568	0.544
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 S6K1(Thr389)	1.00	1.03	1.10	1.05	0.98	0.83	0.095	0.125	0.022	0.049
磷酸腺苷活化的蛋白激酶 AMPK(Thr172)	1.00	0.76	0.75	1.15	1.20	1.55	0.338	0.626	0.014	0.078

chinaXiv:201812.00283v1

Lys 浓度 Lys concentration/(mmol/L)

0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 16.0

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR

磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 P-mTOR(Ser2 448)

真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4EBP1

磷酸化真核起始因子 4E 结合蛋白 1 P-4EBP1(Thr37)

真核起始因子 4E eIF4E

磷酸化真核起始因子 4E P-eIF4E(Ser209)

p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 S6K1

磷酸化 p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 P-S6K1(Thr389)

磷酸腺苷活化的蛋白激酶 AMPK

磷酸化磷酸腺苷活化的蛋白激酶 P-AMPK(Thr172)

图 1 Lys 对 BMECs 内 mTOR 信号通路磷酸化水平的影响

Fig.1 Effects of Lys on phosphorylation of mTOR signaling pathway in BMECs

3 讨 论

酪蛋白在牛乳蛋白中大约占 80%，它主要包括 CSN1S1、α_{s2}-酪蛋白（α_{s2}-casein，CSN1S2）、CSN2 和 CSN3，尤以 CSN1S1 和 CSN2 的含量较高，分别为 40%和 25%左右[9]。*CSN1S1*、*CSN2* 和 *CSN3* 是反映乳蛋白合成的 3 个主要基因，其表达量会影响 BMECs 内乳蛋白的合成。Nan 等[10]研究发现，与 0 mmol/L 的 Lys 组相比，1.2 mmol/L 的 Lys 组显著的上调了 BMECs 内 *CSN1S1*、*CSN2* 和 *CSN3* 基因的表达。本研究结果得出，Lys 显著促进了 *CSN1S1*、*CSN2* 和 *CSN3* 基因表达，均以 1.0~2.0 mmol/L 组促进效果较好，且 Lys 对 *CSN3* 和 *CSN1S1* 基因表达的促进效果呈剂量依赖关系，高剂量的 16.0 mmol/L 组显著抑制其表达。

酪氨酸激酶（JAK）/信号转导和转录激活因子（STAT）和 mTOR 信号通路是调控蛋白质合成的 2 条重要通路[11-12]。JAK/STAT 信号通路中，对乳蛋白合成调控的研究主要集中在 *JAK2*/*STAT5* 信号通路上。Liu 等[13]研究指出，添加 Lys 可显著提高 BMECs 内 *STAT5* 基因表达量，然而 *STAT5* 沉默后 *CSN2* 基因表达量下降，过表达后上调其表达，说明 Lys 可能通过 *JAK2*/*STAT5* 信号通路影响乳蛋白的合成。本研究发现，Lys 可显著促进 *STAT5* 和 *JAK2* 基因表达，*STAT5* 以 2.0 mmol/L 组促进效果最好，但高剂量 4.0~16.0 mmol/L 组显著抑制其表达，与 Lys 对酪蛋白基因表达的作用效果相似，进一步验证了 Lys 可能通过 *JAK2*/*STAT5*

信号通路促进乳蛋白的合成。

mTOR 信号通路在蛋白质翻译水平上调控乳蛋白合成[12]。4*EBP*1 和 *S*6*K*1 是 *mTOR* 信号通路下游的 2 个关键元件，当 *mTOR* 被上游信号激活后会通过调节 *S*6*K*1 和 4*EBP*1 这 2 条下游通路来调控动物机体内蛋白质的翻译；然而 4EBP1 和 elF4E 的结合会抑制蛋白质翻译，当 mTOR 激活 4EBP1 磷酸化后，磷酸化的 4EBP1 与 elF4E 脱离，降低了对蛋白质翻译的抑制，促进蛋白质的合成。本研究发现，适宜浓度的 Lys 促进了 *mTOR*、*S*6*K*1 基因表达和 *eIF*4*E* 基因表达及磷酸化，但 8.0~16.0 mmol/L 组其促进作用减弱或具有抑制作用。Lys 浓度的增加抑制了 4*EBP*1 的基因表达，而对其磷酸化水平无显著影响。毕微微[14]研究发现，添加 Lys 上调了 BMECs 内 mTOR 信号通路中与乳蛋白翻译相关的 *mTOR* 和 *S*6*K*1 基因表达，但下调了 4*EBP*1 基因的表达，与本研究的结果相似。这些研究结果提示 Lys 可能通过促进 mTOR 信号通路相关基因表达和磷酸化剂量依赖性地影响乳蛋白合成基因的表达。

氨基酸和 ATP 是蛋白质合成过程中非常重要的 2 个因素，二者的供给直接影响乳品质的高低。乳腺合成和分泌乳蛋白时需要大量的能量，大约会消耗掉 BMECs 内约 50%的 ATP[15]。AMPK 是细胞内主要的能量感受器，参与多种代谢信号通路，调节机体代谢和能量的供需平衡[16]。AMPK 还是 mTOR 信号通路的上游调控元件，负调控 mTOR 介导的下游信号通路[17]。当细胞内 ATP/一磷酸腺苷（AMP）降低或营养物质缺乏会激活 AMPK，从而增加 ATP 的分解和减少 ATP 的合成[18-19]。因此，*AMPK* 可以通过 *mTOR* 信号通路从蛋白质翻译水平来调控乳蛋白的合成。王珊珊[20]研究表明，随着氨基酸浓度的下降细胞内营养物质和能量水平也下降了，进而激活 AMPK，抑制 mTOR、S6K1 和 4EBP1 的磷酸化，减少乳蛋白的合成。本研究发现，添加一定浓度的 Lys 在提高 *mTOR* 基因表达量及 ATP 含量的同时，也促进了 *AMPKα*1 基因表达，但高剂量的 16.0 mmol/L 组反而显著降低了 *mTOR* 和 *AMPKα*1 基因的表达量，与前人的研究结果不尽一致，造成这些结果差异的原因尚不清楚，需要进一步探讨。

本研究结果也得出，Lys 浓度与 ATP 含量，*CSN*1*S*1、*CSN*3、*mTOR*、*eIF*4*E* 和 *AMPKα*1 的基因表达量以及 mTOR、S6K1 和 AMPK 的磷酸化水平存在显著或趋于显著的剂量依赖关系，ATP 含量以 2.0~16.0 mmol/L 组，*CSN*1*S*1、*CSN*2、*STAT*5 基因表达量以 1.0~2.0 mmol/L 组，*mTOR* 基因表达量以 1.0~8.0 mmol/L 组，*CSN*3 以 1.0~4.0 mmol/L 组，*JAK*2 以 1.0~16.0

chinaXiv:201812.00283v1

chinaXiv:201812.00283v1

mmol/L 组，*S6K1* 以 2.0 mmol/L 组，*eIF4E* 基因表达量以 2.0~8.0 mmol/L 组，eIF4E 磷酸化水平以 2.0~4.0 mmol/L 组时促进效果较好；但 16.0 mmol/L 组的调节作用减弱或呈相反的变化趋势。李喜艳[7]研究发现，虽然提高了 BMECs 培养基中个别氨基酸的添加量，但是会导致氨基酸配比不平衡进而严重影响乳蛋白的合成，因此，高剂量 Lys 会抑制乳蛋白合成相关基因表达可能与氨基酸配比不平衡有关。此外，Mercier 等[21]的研究指出，BMECs 的数量在某种程度上可能决定了乳蛋白的合成量，同时，高海娜等[22]研究也发现，添加 0.5~2.0 mmol/L Lys 促进 BMECs 增殖，但高剂量会抑制其增殖，与本研究适宜浓度 Lys 促进细胞增殖，而高剂量抑制其增殖的结果相似，进一步解释了高剂量 Lys 会抑制乳蛋白合成相关基因表达。因此，Lys 浓度为 1.0~2.0 mmol/L 时，对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的促进效果较好。

Brazil 等[23]指出，磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）/mTOR 信号通路是调控 *mTOR* 信号通路非常重要的上游调控通路，对 *mTOR* 信号通路起正调控作用。还有研究指出，Akt 可能通过结节性硬化症复合物 1（TSC1）/结节性硬化症复合物 2（TSC2）间接地调控 mTOR 信号通路[24]。这些结果说明，Lys 可能是通过 *PI3K*/*Akt*/*mTOR* 信号通路调控 mTOR 通路进而促进乳蛋白合成相关基因的表达，但本试验并未对 *PI3K*/*Akt*/*mTOR* 信号通路进行研究，具体调控机理尚不清楚，需要进一步研究。

4 结 论

Lys 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的促进效果呈剂量依赖关系，以 1.0~2.0 mmol/L 时较好，高剂量 16.0 mmol/L Lys 抑制乳蛋白合成相关基因的表达，Lys 可能通过 *JAK2*/*STAT5* 和 *mTOR* 信号通路促进乳蛋白合成相关基因的表达。

参考文献：

[1] MAXIN G,RULQUIN H,GLASSER F.Response of milk fat concentration and yield to nutrient supply in dairy cows[J].Animal,2011,5(8):1299–1310.

[2] 李沐阳,闫素梅,韩慧娜,等.玉米秸秆饲粮条件下阴外动脉灌注氨基酸混合物对奶牛乳腺内短链脂肪酸摄取规律的影响[J].动物营养学报,2017,29(6):2134－2142.

[3] 王立娜.氨基酸与 STAT5A 基因互作对奶牛乳腺上皮细胞泌乳的调节作用及机理[D].博士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2014.

[4] GIALLONGO F,HARPER M T,OH J,et al.Effects of rumen-protected methionine,lysine,and histidine on lactation performance of dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2016,99(6):4437–4452.

[5] SHENG R,YAN S M,QI L Z,et al.Effect of the ratios of acetate and β-hydroxybutyrate on the expression of milk fat- and protein-related genes in bovine mammary epithelial cells[J].Czech Journal of Animal Science,2015,60(12):531–541.

[6] 高海娜.亮氨酸、组氨酸、赖氨酸和蛋氨酸对奶牛乳腺上皮细胞中酪蛋白合成的影响及调控机理研究[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2016.

[7] 李喜艳.奶牛乳腺上皮细胞中赖氨酸蛋氨酸配比模式对酪蛋白合成的影响及机理研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2011.

[8] SHENG R,YAN S M,QI L Z,et al.Effect of the ratios of unsaturated fatty acids on the expressions of genes related to fat and protein in the bovine mammary epithelial cells[J].*In Vitro* Cellular & Developmental Biology：Animal,2015,51(4):381–389.

[9] FARRELL H M,JIMENEZ-FLORES R,BLECK G T,et al.Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision[J].Journal of Dairy Science,2004,87(6):1641–1674.

[10] NAN X M,BU D P,LI X Y,et al.Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells[J].Physiological Genomics,2014,46(7):268–275.

[11] BROCKMAN J L,SCHROEDER M D,SCHULER L A.PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway[J].Molecular Endocrinology,2002,16(4):774–784.

[12] RIUS A G,APPUHAMY J A D R N,CYRIAC J,et al.Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids[J].Journal of Dairy Science,2010,93(7):3114–3127.

[13] LIU X F,LI M,LI Q Z,et al.*STAT5*a increases lactation of dairy cow mammary gland epithelial cells cultured *in vitro*[J].*In Vitro* Cellular & Developmental Biology:Animal,2012,48(9):554–561.

[14] 毕微微.蛋氨酸、赖氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞泌乳机能的影响[D].硕士学位论文.

chinaXiv:201812.00283v1

chinaXiv:201812.00283v1

哈尔滨:东北农业大学,2013.

[15] HANIGAN M D,FRANCE J,MABJEESH S J,et al.High rates of mammary tissue protein turnover in lactating goats are energetically costly[J].The Journal of Nutrition,2009,139(6):1118–1127.

[16] 綦松智,吴登俊,张中昱.mTOR 对信号通路调控的研究进展[J].中国畜牧杂志,2010,46(1):57–60.

[17] APPUHAMY J A D R N,NAYANANJALIE W A,ENGLAND E M,et al.Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells[J].Journal of Dairy Science,2014,97(1):419–429.

[18] TOERIENA C A,CANT J P.Abundance and phosphorylation state of translation initiation factors in mammary glands of lactating and nonlactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2007,90(6):2726–2734.

[19] HAYASHI A A,NONES K,ROY N C,et al.Initiation and elongation steps of mRNA translation are involved in the increase in milk protein yield caused by growth hormone administration during lactation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(5):1889–1899.

[20] 王珊珊.葡萄糖和氨基酸应激对奶牛乳腺上皮细胞β-酪蛋白及信号通路相关蛋白磷酸化表达的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.

[21] MERCIER J C,VILOTTE J L.Structure and function of milk protein genes[J].Journal of Dairy Science,1993,76(10):3079–3098.

[22] 高海娜,韩荣伟,郑楠,等.赖氨酸对原代奶牛乳腺上皮细胞中酪蛋白及 mTOR 信号通路相关基因表达的影响[J].甘肃农业大学学报,2015,50(3):7–15.

[23] BRAZIL D P,HEMMINGS B A.Ten years of protein kinase B signalling:a hard Akt to follow[J].Trends in Biochemical Sciences,2001,26(11):657–664.

[24] HUANG S L,HOUGHTON P J.Targeting mTOR signaling for cancer therapy[J].Current Opinion in Pharmacology,2003,3(4):371–377.

Effects of Lysine on Gene Expressions and Protein Phosphorylation Involved in Milk Protein

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201812.00283v1

Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

CHEN Lu ZHAO Yanli GUO Xiaoyu SHI Binlin YAN Sumei*

(*Collage of Animal Science, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China*)

Abstract: The objective of this study was to determine the effects of lysine (Lys) on gene expressions and protein phosphorylation involved in milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells (BMECs). The 3rd generation BMECs were randomly divided into six group with six replicates per group, cells in different groups were cultured in medium with 0.5 (control), 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 and 16.0 mmol/L Lys, respectively. After 48 h cultivation at 37 ℃ and 5% CO_2, adenosine triphosphate (ATP) content was measured by the method of chemiluminescence, expression levels of genes involved in milk protein synthesis were determined by real-time PCR, and phosphorylation levels of proteins involved in milk protein synthesis were determined by Western blotting method. The results showed as follows: with the increase of Lys concentration, ATP content tended to be quadratically significantly increased （P=0.050）; expression levels of κ-casein （*CSN*3） (P=0.093), mammalian target of rapamycin (*mTOR*) (P=0.005), eukaryotic initiation factor 4E （*eIF*4*E*） (P=0.076) and adenosine 5'-mono-phpsphate-active protein kinase α1（*AMPKα*1）genes (P=0.045) were significantly or tended to significantly quadratically changed, all showed firstly increased then decreased; expression level of α_{s1}-casein （*CSN*1*S*1） gene（P=0.081）, phosphorylation levels of mTOR（P=0.038） and ribosomal protein S6 kinase 1 （S6K1） （P=0.022） were significantly or tend to significantly linearly decreased; phosphorylation level of adenosine 5'-mono-phpsphate-active protein kinase （AMPK） was significantly linearly increased (P=0.014). The results of analysis of variance showed that the supplementation of Lys had significantly effects on ATP content, expression levels of genes involved in milk protein synthesis and phosphorylation level of eIF4E （P<0.05）, among them, the improvement effects of 2.0 to 16.0 mmol/L Lys for ATP content, 1.0 to 2.0 mmol/L Lys for *CSN*1*S*1, β-casein （*CSN*2）, signal transducer and activator of transcription 5 （*STAT*5）gene expression levels, 1.0 to 8.0 mmol/L Lys for *mTOR* gene expression level, 1.0 to 4.0 mmol/L Lys

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com （责任编辑 王智航）

ChinaXiv合作期刊

for *CSN*3 gene expression level， 1.0 to 16.0 mmol/L Lys for Janus kinase 2 （*JAK*2） gene expression level, 2.0 mmol/L Lys for *S*6*K*1 gene expression level, 2.0 to 8.0 mmol/L Lys for *eIF*4*E* gene expression level, 2.0 to 4.0 mmol/L Lys for eIF4E phosphorylation level were better, however, 16.0 mmol/L Lys had inhibition effects on expression levels of *CSN*1*S*1, *CSN*3, *STAT*5 and *mTOR* genes, and 1.0 to 16.0 mmol/L Lys had inhibition effect on expression level of eukaryotic initiation 4E binding protein 1 (4*EBP*1) gene. In conclusion, the optimal Lys concentration for gene expressions involved in milk protein synthesis in BMECs is 1.0 to 2.0 mmol/L.

Key words: dairy cow; bovine mammary epithelial cell; lysine; milk protein

chinaXiv:201812.00283v1